



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

‘Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ IRAK4 ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ
ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ.’

Νικολάου Ευαγγελία

ΛΑΡΙΣΑ 2019



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

BACHELOR THESIS

**‘THE ROLE OF IRAK4 IN PATHOGENESIS AND PHENOTYPE IN
PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES’**

Nikolaou Evangelia

LARISSA 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

κ. Σπελέτας Ματθαίος

Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

κ. Γιακουντής Αντώνιος

Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

κ. Γιαννακούλας Νικόλαος

Επίκουρος καθηγητής Παθολογίας – Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αφιερωμένη στην οικογένειά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
ABSTRACT	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
1.ΑΝΟΣΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	12
1.1 ΕΜΦΥΤΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ	12
1.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ.....	14
1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ.....	17
2.IRAK4	21
2.1 ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ.....	21
2.2 ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ	22
2.3 ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ.....	26
2.4 IRAK4 ΚΑΙ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	28
2.5 IRAK4 ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ.....	29
3.ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	31
3.1 IRAK4 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	32
3.1.1.ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ	32
3.1.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	33
3.1.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ.....	33
3.1.4 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ IRAK4.....	35
3.1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	36
3.1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	39

4. ΣΚΟΠΟΣ.....	40
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
5.ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ.....	41
6.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	42
6.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	42
6.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....	43
6.2.1 PCR ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ IRAK4.....	43
6.2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	45
6.2.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....	46
6.2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	48
7.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του κυρίου Σπελέτα Ματθαίου, καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, δίνοντας μου την δυνατότητα να την διεκπεραιώσω με τις συμβουλές και την καθοδήγησή του καθ'όλο το διάστημα που μελετούσα στο εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον κύριο Γιακουντή Αντώνιο, επίκουρο καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και τον κύριο Γιαννακούλα Νικόλαο, επίκουρο καθηγητή Παθολογίας - Αιματολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιπροσθέτως, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ξεχωριστά την Σεβδαλή Ειρήνη και την Τσιντή Γερασιμίνα, οι οποίες παρότι εργάζονταν στο εργαστήριο με βοήθησαν και με καθοδήγησαν καθ'όλη την διάρκεια της εργαστηριακής μου μελέτης.

Τέλος, το σημαντικότερο ευχαριστώ μου ανήκει στους γονείς μου και την αδελφή μου, οι οποίοι σε όλο το διάστημα της πανεπιστημιακής μου εκπαίδευσης με στήριξαν και μου παρείχαν την ευκαιρία να σπουδάσω και να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου πάνω σε αυτό το αντικείμενο.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AP-1 (Activator Protein-1) Πρωτεΐνη ενεργοποιητής 1

ATP (AdenosineTri-Phosphate) Τριφωσφορική αδενοσίνη

CRP (C-Reactive Protein) C-αντιδρώσα πρωτεΐνη

DAMP (Damage Associated Molecular Patterns) Σχετιζόμενα με βλάβη μοριακά πρότυπα

DNA Deoxy- Ribonucleic Acid (δεοξυριβονουκλεϊκόξύ)

IκB (Inhibitor of κB) Αναστολέας του κB.

IL (Interleukin) Ιντερλευκίνη

IRAK4 (Interleukin Associated Receptor Kinase 4) Κινάση σχετιζόμενη με τον υποδοχέα των ιντερλευκινών.

LPS (Lipopolysacharite) Βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης

MBL (Mannose Binding Lectin) Λεκτίνη συνδεόμενη με μαννόζη

MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88) Πρωτεΐνη πρωτοπαθούς απάντησης της διαφοροποίησης του μυελού

NEMO (NF-κB Essential modulator)NF-κB σημαντικός διαμορφωτής

NF-κB (Nuclear Factor Kappa – Light – Chain –Enhancer of activated B cells) Πυρηνικός παράγοντας κάπα – ελαφριάς – αλυσίδας ενισχυτής των ενεργών B κυττάρων

NK (Natural Killer) Φυσικά κυτταροκτόνα λεμφοκύτταρα

NLR (Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptors)

NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain)

PAMP (Pathogen – Associated Molecular Patterns) Μοριακά πρότυπα των παθογόνων.

PCR (Polymerase Chain Reaction) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

RLR (Retinoic Acid Inducible GeneI-Like Receptors)

SRs (scavenger receptors) Υποδοχείς ‘ρακοσυλλέκτες’

TAB (TAK1 binding protein) TAK1 Προσδένουσα πρωτεΐνη

TAK1 (TGF- β activated kinase 1) TGF- β ενεργή κινάση 1

TIRAP (Toll-Interleukin-1 Receptor domain Adaptor Protein) Toll-ιντερλευκίνη-1 υποδοχέας επικράτειας πρόσδεσης πρωτεΐνη

TLR (Toll-Like Receptor) Υποδοχέας τύπου Toll

TRAF-6 (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6) Παράγοντας 6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η IRAK4 είναι μια πρωτεΐνη με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα στα κύτταρα της μυελικής σειράς (μακροφάγα-μονοκύτταρα, πολυμορφοπύρηνα). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι των TLR και της οικογένειας των IL-1, όπου ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της IRAK4 μέσω φωσφορυλίωσης της. Η τελευταία με την σειρά της επάγει την έκφραση γονιδίων, που προάγουν την φλεγμονή μέσω της ενεργοποίησης του κλασικού μονοπατιού του NF-κΒ. Βλάβες στο γονίδιο *IRAK4* έχουν σχετιστεί με νεοπλασματικές και αυτοάνοσες διαταραχές. Κυρίως όμως, σχετίζονται με την εμφάνιση υποτροπιάζουσών και επικίνδυνων για την ζωή βακτηριακών λοιμώξεων σε ασθενείς με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες. Μεταλλάξεις σε ομόζυγη ή διπλά ετερόζυγη κατάσταση οδηγούν στην εκδήλωση της IRAK4 ανοσοανεπάρκειας. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *IRAK4*, σε ασθενείς με εμμένουσες και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις από το Ιατρείο Ανοσοανεπαρκειών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η ανάλυση οδήγησε στην ανίχνευση μετάλλαξης σε μια μόνο ασθενή, όπου διαπιστώθηκε ότι κληρονομήθηκε από την υγιή μητέρα της. Και οι δύο έφεραν την μετάλλαξη σε ετερόζυγη κατάσταση. Συνεπώς δεν πληροί τα κριτήρια για την διάγνωση IRAK4 ανεπάρκειας. Η παραπάνω μελέτη αναδεικνύει τη σημασία διενέργειας γονιδιακών αναλύσεων σε όλο και περισσότερα ανοσογονίδια, καθώς διαπιστώνεται η ύπαρξη σπάνιων βλαβών και σε ασθενείς από τον ελληνικό χώρο. Τέτοιου είδους μελέτες θα βοηθήσουν στην καλύτερη και έγκαιρη διάγνωση σπάνιων νοσημάτων, όπως οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, ενώ αναδεικνύονται και νέες γενετικές συσχετίσεις, οι οποίες βοηθούν στην ερμηνεία των βιολογικών συστημάτων και εξηγούν την παθοφυσιολογία σπάνιων νοσημάτων.

ABSTRACT

IRAK4 is a protein with kinase serine/threonine activity. This protein is located basically in cytoplasm in myeloid cells (macrophages-monocytes and neutrophils). IRAK4 participates in TLR and IL-1 family pathway, where activation of these receptors has as result, activation of IRAK4 through its phosphorylation. IRAK4 induces the gene expression, which promote inflammation through activation of the classic pathway of NF- κ B. Variants in *IRAK4* gene are related with neoplastic and autoimmune disorders. Mutations in *IRAK4* are also associated with the appearance of persistent and life threatening bacterial infections in patients with primary immunodeficiencies. Homozygous or compound heterozygous mutations lead to the expression of IRAK4 immunodeficiency. The aim of this project was the molecular analysis of *IRAK4* gene, in patients with infections from outpatient clinic of primary immunodeficiencies of the University General Hospital in Larissa. The completion of this analysis led to the detection of a mutation, in one patient, where it was shown that was inherited from her healthy mother. Both of them carried the mutation in heterozygous condition. Therefore this patient doesn't fulfill the criteria for the diagnosis of IRAK4 deficiency. This project indicates the need and the importance of studying new immune genes, since an increasing number of genetic defects are detected in patients with rare syndromes in Greece. Thus, accurate and early diagnosis can be established for rare diseases such as primary immunodeficiencies. At last but not least, these analyses contribute to the better understanding of the pathophysiology of primary immunodeficiencies and consequently to the better interpretation of the function of the immune system.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΑΝΟΣΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1.1 ΕΜΦΥΤΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Το ανοσιακό σύστημα του ανθρώπου διακρίνεται στην έμφυτη (innate) και την προσαρμοστική (adaptive) ή επίκτητη (acquired) ανοσία. Η έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού. Χαρακτηριστικό της είναι η ταχεία, μη ειδική ανοσιακή απόκριση έναντι των αντιγόνων που προκάλεσαν την διέγερσή της. Οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας δεν είναι ειδικοί για ένα παθογόνο αλλά αναγνωρίζουν δομές αυτού, μέσω υποδοχέων. Η έμφυτη ανοσία περιλαμβάνει τους πρωτογενείς φραγμούς, οι οποίοι είναι το δέρμα και οι βλεννογόνοι, καθώς και ένζυμα όπως η λυσοζύμη. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα φαγοκύτταρα και τα αντιμικροβιακά συστατικά που συντίθενται από τον ξενιστή.

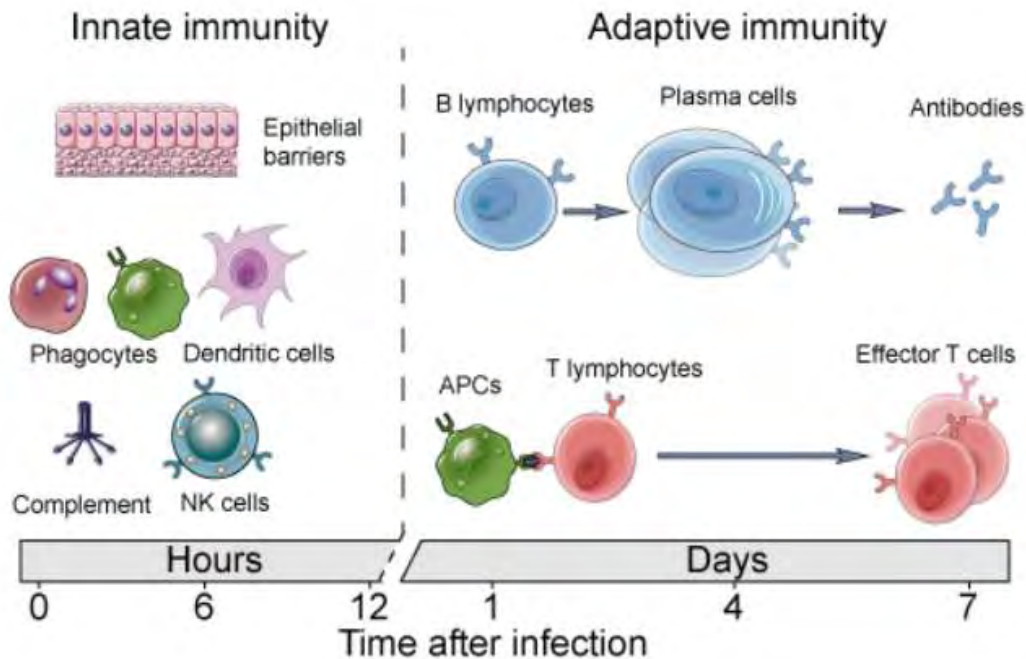
Στις έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις περιλαμβάνονται:

1. Η δημιουργία φλεγμονής, η οποία είναι μια μη ειδική απόκριση σε έναν εισβολέα ή σε μια ιστική βλάβη. Σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή διαδραματίζουν τα εξειδικευμένα στην φαγοκυττάρωση, ουδετερόφιλα και μακροφάγα, ενώ επίσης συμβάλλουν υποστηρικτικά και άλλα ανοσιακά κύτταρα.
2. Η έκκριση ιντερφερονών, μιας οικογένειας πρωτεϊνών που πυροδοτούν τους μη ειδικούς μηχανισμούς άμυνας κυρίως έναντι των ιών.
3. Η ενεργοποίηση των φυσικών κυτταροκτόνων λεμφοκυττάρων (NK-λεμφοκύτταρα). Τα φυσικά κυτταροκτόνα λεμφοκύτταρα στοχεύουν έναντι προσβεβλημένων από ιούς κυττάρων, καθώς επίσης έναντι καρκινικών κυττάρων.
4. Η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Το σύστημα του συμπληρώματος είναι μια ομάδα πρωτεϊνών του πλάσματος που όταν

ενεργοποιηθούν προκαλούν την καταστροφή των ξένων κυττάρων προσβάλλοντας την κυτταροπλασματική μεμβράνη τους.

Η προσαρμοστική ή επίκτητη ανοσία αναγνωρίζει και εξουδετερώνει ειδικά, μόρια και μικροοργανισμούς με τα οποία ο οργανισμός έχει έρθει ήδη σε επαφή και έχει δημιουργήσει ένα εξειδικευμένο αμυντικό σύστημα έναντι αυτών. Η προσαρμοστική ανοσία είναι υψηλά ποικιλόμορφη. Ωστόσο χρειάζεται αρκετό χρόνο (ημέρες) προκειμένου να ολοκληρωθεί η ανοσιακή απόκριση και να αντιμετωπιστεί ο εκάστοτε μικροοργανισμός. Τα πρωταρχικά συστατικά της προσαρμοστικής ανοσίας είναι τα λεμφοκύτταρα, οι υποδοχείς που είναι ειδικοί για τα αντιγόνα και τα αντισώματα.

Είναι αρκετά σημαντικό να αναφερθεί ότι υπάρχει αλληλεπίδραση της έμφυτης με την προσαρμοστική ανοσία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια αποτελεσματικότερη και πιο συνδυαστική απόκριση από ότι κάθε κλάδος ξεχωριστά. Για την διέγερση των κυττάρων της προσαρμοστικής ανοσίας είναι απαραίτητη η παρουσίαση των αντιγόνων σε αυτά, από τα φαγοκύτταρα. Μετά από αυτή την αλληλεπίδραση επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή διαλυτών πρωτεϊνών, των αντισωμάτων, που έχουν ειδικότητα έναντι των αντιγόνων που προκάλεσαν την παραγωγή τους. Σημαντικός σύνδεσμος ανάμεσα στην έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία είναι και οι υποδοχείς TLR των οποίων η δράση θα αναλυθεί εκτενώς στην συνέχεια[20][25].



Εικόνα.1 : Σχηματική απεικόνιση της φυσικής και προσαρμοστικής ανοσίας-βασικά στοιχεία και χρόνος δράσης μετά την μόλυνση.

Πηγή: <https://www.creative-diagnostics.com/innate-and-adaptive-immunity.htm>

1.2.ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑ ΤΗΣ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ

Βασικά κυτταρικά στοιχεία του έμφυτου ανοσιακού συστήματος είναι τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, τα ουδετερόφιλα είναι εξειδικευμένα για την φαγοκυττάρωση και την θανάτωση. Είναι τα πρώτα κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν προς την περιοχή της μόλυνσης μέσω μιας πληθώρας χημειοτακτικών παραγόντων όπως οι χημειοκίνες. Τα ουδετερόφιλα είναι απαραίτητα για την άμυνα έναντι βακτηρίων και μυκήτων ενώ φέρουν στην επιφάνεια τους Toll-like υποδοχείς και όχι μόνο. Επιπρόσθετα, δεν ασκούν αντιγονοπαρουσίαση. Πιο συγκεκριμένα περιορίζουν την εξάπλωση των μικροοργανισμών καθώς και των προϊόντων τους μέσω φαγοκυττάρωσης. Εκτός από τα παραπάνω, τα ουδετερόφιλα παράγουν κυτταροκίνες, που προάγουν τη φλεγμονή (π.χ.IL-1 β , IL-6, TNF α), καθώς και χημειοκίνες όπως είναι η IL-8.

Όσον αφορά τα μακροφάγα, αυτά ενεργοποιούνται από μια πληθώρα ερεθισμάτων. Οι υποδοχείς TLRs των μακροφάγων, αναγνωρίζουν μικροβιακά χαρακτηριστικά όπως LPS και πεπτιδογλυκάνες, ενώ οι υποδοχείς κυτταροκινών ανιχνεύουν κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από άλλα κύτταρα κατά την διάρκεια μιας φλεγμονώδους απόκρισης. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα μακροφάγα παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα θανάτωσης των μικροβίων που έχουν ενδοκυτταρώσει. Ένας άλλος σημαντικός ρόλος που επιτελούν είναι ο συντονισμός άλλων κυττάρων και ιστών του ανοσιακού συστήματος. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκτός από τις κυτταροκίνες παράγουν και τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος, οι οποίες προάγουν την φλεγμονή και βοηθούν στην θανάτωση των παθογόνων. Επιπλέον, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αποδόμησης παραγόντων που είναι απαραίτητοι για την επιβίωση των ενδοκυττάρων βακτηρίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η αποδόμηση της τρυπτοφάνης από το ένζυμο ινδολαμίνη και η δέσμευση του σιδήρου από την λακτοφερρίνη. Ευρύτερες λειτουργίες των μακροφάγων σχετίζονται με διαδικασίες καταστολής της φλεγμονής μετά από φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών ουδετεροφίλων, με την κάθαρση των νεκρών και αποπτωτικών κυττάρων γενικά, καθώς και με διαδικασίες επούλωσης και αναδιαμόρφωσης των ιστών.

Από την άλλη, τα φυσικά κυτταροκτόνα λεμφοκύτταρα NK, αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στις ιικές μολύνσεις. Ένας σημαντικός ρόλος που διαδραματίζουν αφορά την αναγνώριση και την εξουδετέρωση εξαλλαγμένων κυττάρων και μολυσμένων κυττάρων από ενδοκυττάρια παθογόνα. Τα ενεργοποιημένα NK κύτταρα είναι παραγωγοί μιας ποικιλίας κυτταροκινών, οι οποίες ρυθμίζουν άλλα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος με αποτέλεσμα την διαμόρφωση και την τροποποίηση των μηχανισμών άμυνας του οργανισμού. Χαρακτηριστικό είναι ότι τα NK κύτταρα παράγουν ιντερφερόνη- γ και TNF- α , δύο ανοσορρυθμιστικές κυτταροκίνες, με ποικίλες δράσεις όπως η διέγερση και η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων.

Τέλος, τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν έναν σημαντικό σύνδεσμο ανάμεσα στην έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία. Προέρχονται είτε από την μυελική (μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα), είτε από την λεμφική σειρά (πλασματοκυτταροειδή ή λεμφοειδή δενδριτικά κύτταρα). Τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα χρησιμοποιούν μια ποικιλία υποδοχέων PRRs (Pattern Recognition Receptors), ειδικά υποδοχείς TLRs, ώστε να αναγνωρίζουν τα παθογόνα. Επιπρόσθετα, τα δενδριτικά κύτταρα παράγουν ρίζες οξυγόνου (ROS) και μονοξειδίου του αζώτου ενώ παράγουν και αντιμικροβιακά πεπτίδια [20][26][25].



Εικόνα 2 :Απεικόνιση των συτευτικών κυττάρων, των φυσικών κυτταροκτόνων, των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των ουδετεροφίλων.

Πηγή : <https://opentextbc.ca/biology/chapter/12-2-innate-immunity/>

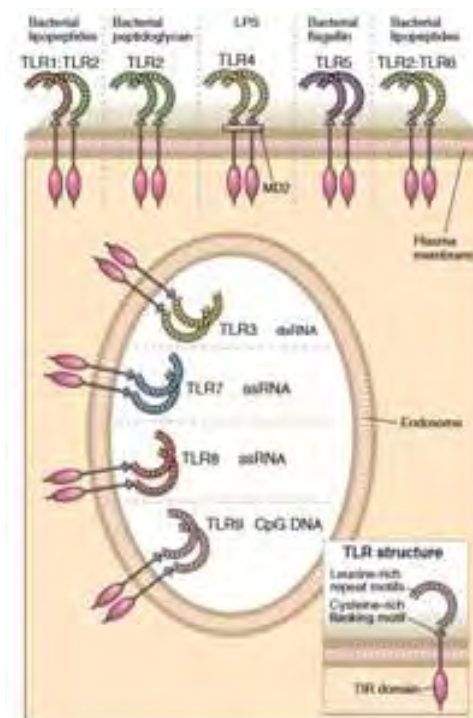
Εκτός από τα κύτταρα στην φυσική ανοσία συμβάλλουν και διαλυτά μόρια όπως η λυσοζύμη, οι ιντερφερόνες και συστατικά του συμπληρώματος. Αρχικά, όσον αφορά την λυσοζύμη, είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο το οποίο έχει την ικανότητα να διασπά το στρώμα πεπτιδογλυκάνης του τοιχώματος των βακτηρίων. Οι ιντερφερόνες είναι μια ομάδα πρωτεϊνών, οι οποίες εκκρίνονται από κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιούς. Επιπρόσθετα, έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται σε γειτονικά κύτταρα και να επάγουν αντι-ική δράση. Τέλος, το συμπλήρωμα απαρτίζεται από πρωτεΐνες, οι οποίες κυκλοφορούν ανενεργές στο αίμα. Ενεργοποιείται από την σύνδεση αντισωμάτων σε κυτταρικές επιφάνειες ή μέσω αλληλεπιδράσεων των μορίων με συστατικά του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος. Το συμπλήρωμα αποτελεί συνδετικό κρίκο ανάμεσα στην έμφυτη και στην προσαρμοστική ανοσία [20][25].

1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ

Δύο κατηγορίες μοριακών προτύπων προκαλούν την έμφυτη απόκριση. Η πρώτη αφορά τα μοριακά πρότυπα των παθογόνων (PAMPs), όπως οι υδατάνθρακες που συναντώνται συνήθως στα τοιχώματα βακτηριακών κυττάρων. Τα PAMPs είναι εξωγενή, προέρχονται δηλαδή από εξωτερικούς παράγοντες. Η δεύτερη κατηγορία αφορά τα σχετιζόμενα με βλάβη μοριακά πρότυπα (DAMPs) όπως είναι η εξωκυτταρική τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), που ελευθερώνεται από κατεστραμμένα κύτταρα. Τα DAMPs είναι ενδογενή προέρχονται δηλαδή από τον οργανισμό. Και τα δύο αυτά πρότυπα πυροδοτούν μια σειρά γεγονότων που οδηγούν στην φλεγμονή. Η φλεγμονή είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων η οποία περιλαμβάνει την φαγοκυτταρική απομάκρυνση των παθογόνων και των κατεστραμμένων κυττάρων του ξενιστή. Τα αποκρινόμενα φαγοκύτταρα φέρουν στην επιφάνεια της μεμβράνης τους ή στο κυτταρόπλασμα τους υποδοχείς που αναγνωρίζουν πρότυπα σχετιζόμενα με παράγοντες βλάβης. Για παράδειγμα τα φαγοκύτταρα φέρουν στην κυτταρική τους μεμβράνη πρωτεΐνες γνωστές ως υποδοχείς Toll-like, οι οποίες αναγνωρίζουν τα PAMPs αλλά και τα DAMPs [25].

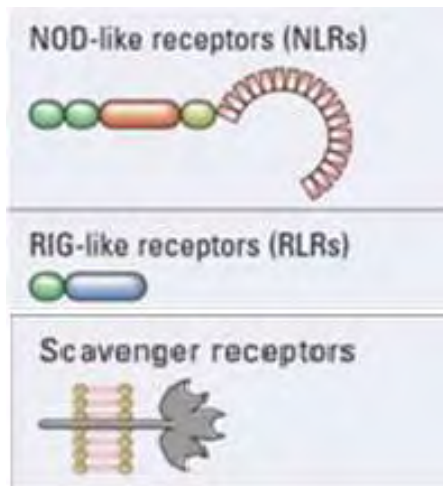
Η αναγνώριση ενός παθογόνου από έναν TLR διεγείρει το φαγοκύτταρο να εγκολπώσει και να καταστρέψει τον μολυσματικό μικροοργανισμό. Η ενεργοποίηση του TLR επάγει την έκκριση χημικών ουσιών από το φαγοκύτταρο μερικές από τις οποίες συμβάλλουν στην φλεγμονή. Οι TLR συνδέουν την έμφυτη ανοσία με την επίκτητη, επειδή κάποιες από τις χημικές ουσίες που εκκρίνονται ως συνέπεια της ενεργοποίησης τους από τα φαγοκύτταρα είναι σημαντικές για την στρατολόγηση κυττάρων του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος. Υπάρχουν 12 διαφορετικοί Toll-like υποδοχείς καθένας από τους οποίους αναγνωρίζει ένα διαφορετικό και συγκεκριμένο σύνολο μοριακών προτύπων. Ορισμένοι αναγνωρίζουν τα Gram θετικά βακτήρια, άλλοι αναγνωρίζουν τα Gram αρνητικά βακτήρια ενώ άλλοι αναγνωρίζουν το ιικό DNA ή RNA.

Υπάρχουν TLRs οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και αναγνωρίζουν εξωκυττάριους προσδέτες ενώ υπάρχουν και εκείνοι, οι οποίοι αναγνωρίζουν ενδοκυτταρικούς προσδέτες όπως το ιικό RNA ή θραύσματα βακτηριακού DNA και εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, όπως τα ενδοσώματα και τα ενδοκυττάρια κυστίδια. Μοιράζονται ένα κοινό δομικό στοιχείο στην εξωκυτταρική περιοχή τους, που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 24 έως 29 αμινοξέων. Αυτά τα δομικά πρότυπα ονομάζονται επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη. Ενδοκυτταρικά διαθέτουν μια υπομονάδα η οποία ονομάζεται TIR και χρησιμεύει ως περιοχή δέσμησης ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Οι προσδέτες των TLRs είναι βασικά δομικά και λειτουργικά συστατικά των παθογόνων. Για παράδειγμα, ένας ιός δεν μπορεί να λειτουργήσει χωρίς το νουκλεϊικό οξύ του, τα Gram αρνητικά βακτήρια δεν μπορούν να υπάρξουν χωρίς τα κυτταρικά τοιχώματα που περιέχουν LPS και οι μύκητες πρέπει να ενσωματώνουν τον πολυσακχαρίτη ζυμοζάνη στα κυτταρικά τους τοιχώματα [8].



Εικόνα 3: Δομή, κυτταρικός εντοπισμός και εξειδικεύσεις των υποδοχέων TLR που εντοπίζονται στα θηλαστικά [32].

Εκτός από τους TLR υποδοχείς υπάρχουν οι ενδοκυττάριοι υποδοχείς RLR (Retinoic Acid Inducible Gene I – Like Receptors), οι οποίοι αναγνωρίζουν ιικό DNA ή RNA στο κυτταρόπλασμα και οι υποδοχείς NLR (Nucleotide – binding Oligomerization Domain –Like Receptors) οι οποίοι αναγνωρίζουν ενδοκυτταρικά PAMPs, για παράδειγμα τμήματα του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος που εγκολλώνονται από ένα φαγοκύτταρο ή παράσιτα που έχουν εισβάλλει σε ένα κύτταρο στόχο τους. Η ενεργοποίηση των RLR από ιικό γενετικό υλικό διεγείρει την σύνθεση της ιντερφερόνης μέσω της οποίας κινητοποιείται ένας εγγενής μηχανισμός αντιμετώπισης των ιών. Οι ενεργοποιημένοι NLR πυροδοτούν τον σχηματισμό στο κυτταρόπλασμα, πολυπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που ονομάζονται φλεγμονοσώματα (inflammasomes) μέρος των οποίων είναι οι ίδιοι οι NLR. Τα φλεγμονοσώματα προκαλούν μια ισχυρή φλεγμονώδη αντίδραση συμπληρώνοντας τις δράσεις που πυροδοτούνται από τους ενεργοποιημένους TLR. Οι πρωτεΐνες NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain) είναι κυτταροπλασματικές και δύο μέλη της οικογένειας NOD1, NOD2 αναγνωρίζουν τα προϊόντα που προέρχονται από βακτηριακές πεπτιδογλυκάνες. Η NOD1 δεσμεύεται στα τριπεπτιδικά προϊόντα αποικοδόμησης πεπτιδογλυκανών και η NOD2 αναγνωρίζει μουραμυλικά διπεπτίδια που προέρχονται από την αποικοδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων των Gram θετικών βακτηρίων. Μembranικοί υποδοχείς είναι και οι υποδοχείς SRs (scavenger receptors), οι οποίοι υπάρχουν στα μακροφάγα και σε πολλούς τύπους δενδριτικών κυττάρων. Εμπλέκονται στην δέσμευση και ενδοκυττάρωση Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, καθώς και στην φαγοκυττάρωση αποπτωτικών κυττάρων του ξενιστή. Ωστόσο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η δράση των συγκεκριμένων υποδοχέων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.



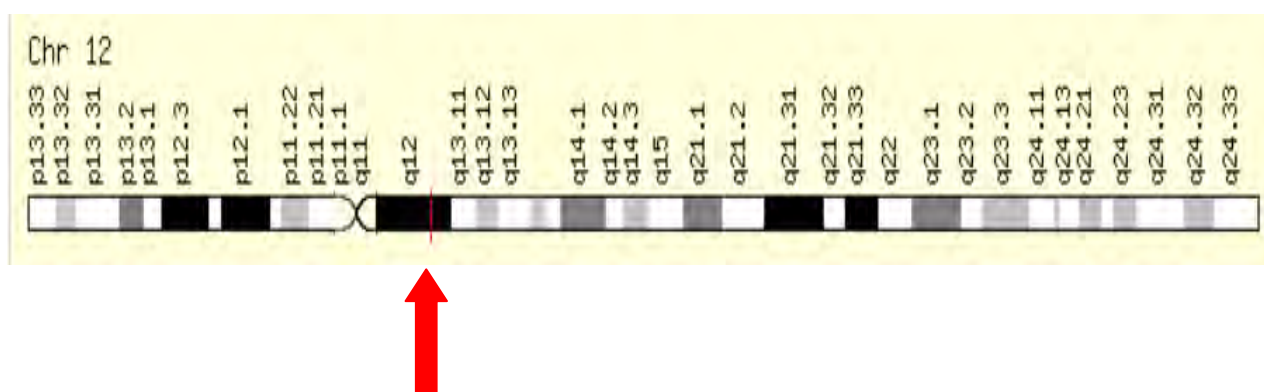
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των RLR, SRs και NLR υποδοχέων [32].

Εκτός όμως από τους μεμβρανικούς υποδοχείς υπάρχουν και τα διαλυτά μόρια, όπως η CRP, η MBL και το συμπλήρωμα. Είναι διαλυτοί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων, που προσδένονται σε μικροβιακές επιφάνειες προάγοντας τη φαγοκυττάρωση ή καθιστώντας τον εισβολέα πιθανότερο στόχο λύσης από το συμπλήρωμα. Ακόμη ένας διαλυτός υποδοχέας είναι η πρωτεΐνη που δεσμεύεται σε λιποπολυσακχαρίτες (LBP). Η LBP αποτελεί σημαντική συνιστώσα του συστήματος, που αναγνωρίζει και στέλνει το μήνυμα για απόκριση ενάντια σε λιποπολυσακχαρίτες, οι οποίοι είναι συστατικά του εξωτερικού κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων[20][32].

2.IRAK4

2.1 ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

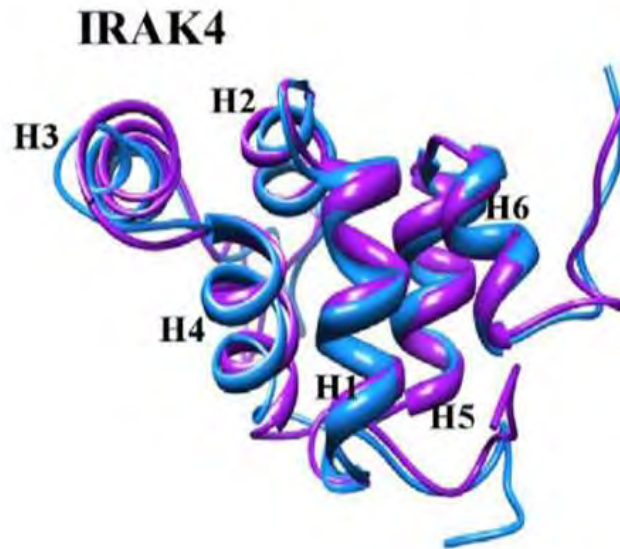
Ένα σημαντικό μόριο – πρωτεΐνη, το οποίο συμμετέχει στο μονοπάτι επαγωγής της φλεγμονής είναι και η κινάση IRAK4. Το γονίδιο *IRAK4* κωδικοποιεί μια κινάση η οποία ενεργοποιεί τον NF-κΒ τόσο στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα Toll-like όσο και στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα των T κυττάρων [16][15]. Το γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 στον μεγάλο βραχίονα, αποτελείται από 30.600 βάσεις (*chr12:43,758,944-43,789,543-GRCh38/hg38*) και έχει χαρτογραφηθεί στην χρωμοσωμική θέση 12q12. Επιπρόσθετα, το συγκεκριμένο γονίδιο διαθέτει 12 εξόνια εκ των οποίων το πρώτο και το τελευταίο αποτελούν μέρος των 5' και 3' αμετάφραστων περιοχών αντίστοιχα. Ένα γονίδιο το οποίο διαθέτει όμοια αλληλουχία με αυτή του *IRAK4*, εντοπίζεται στα θηλαστικά, αλλά επιτελεί διαφορετική λειτουργία είναι το *IRAK1* (παράλογο γονίδιο)[1] [19].



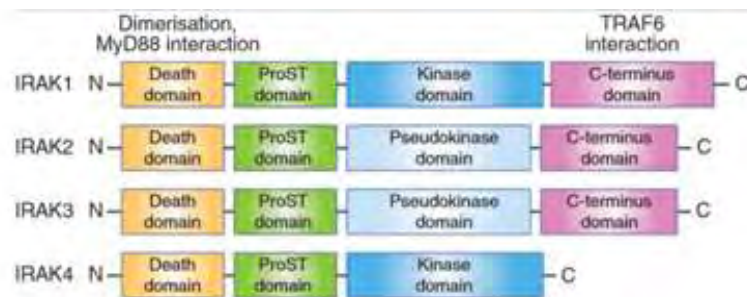
Εικόνα 5: Θέση γονιδίου *IRAK4* στο χρωμόσωμα 12 [19].

2.2 ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η IRAK4 πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια των IRAK κινασών, αποτελείται από 460 αμινοξέα, με μέγεθος 51530 kDa. Είναι το πιο κοντινό ομόλογο στην πρωτεΐνη PELLE που βρίσκεται στην *Drosophila* [16]. Πιο συγκεκριμένα, η οικογένεια αυτή απαρτίζεται από τέσσερις κινάσες, τις IRAK1, IRAK2, IRAK3/M και IRAK4. Ενεργές κινάσες είναι μόνο οι IRAK1 και IRAK4, καθώς στις υπόλοιπες δύο το κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος στην επικράτεια κινάσης αντικαθίσταται με ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στην IRAK2 και με ένα κατάλοιπο σερίνης στην IRAKM [36]. Όλες διαθέτουν μια αμινοτελική επικράτεια θανάτου (death domain), απαραίτητη για τον ομοδιμερισμό και τον ετεροδιμερισμό τους και η οποία μεσολαβεί για την μοριακή αναγνώριση άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες περιέχουν και αυτές επικράτειες θανάτου και μια επικράτεια με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Όσον αφορά την δομή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, η επικράτεια με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος, αποτελούμενη από 268 αμινοξέα (186-454) ενώ η επικράτεια θανάτου αποτελείται από μόλις 85 αμινοξέα (20-105). Εκτός από τις δύο αυτές επικράτειες υπάρχει και μια επιπλέον, η ProST, η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα σερίνης, προλίνης και θρεονίνης. Όπως παρουσιάζεται και στο σχήμα (Εικόνα 7) η IRAK4 κινάση είναι η μόνη από την ομάδα των IRAK κινασών η οποία δεν διαθέτει επέκταση στο καρβοξυτελικό άκρο [1] [21] [36].

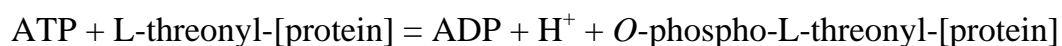
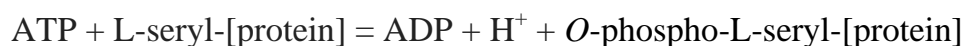


Εικόνα 6 : Τρισδιάστατη απεικόνιση της πρωτεΐνης IRAK4 [36].



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων πρωτεϊνών της οικογένειας IRAK [14].

Δομικά η οικογένεια IRAK είναι μοναδική, εξαιτίας του καταλοίπου τυροσίνης που υπάρχει στον 'φύλακα' (gatekeeper). Πιο συγκεκριμένα για την IRAK4 είναι το αμινοξικό κατάλοιπο Tyr262 [22]. Η κινάση IRAK4 ανήκει στην κατηγορία των τρανσφερασών (EC:2.7.11.1), που σχετίζονται με την μεταφορά λειτουργικών ομάδων με την καταλυτική της δραστηριότητα να απεικονίζεται παρακάτω :

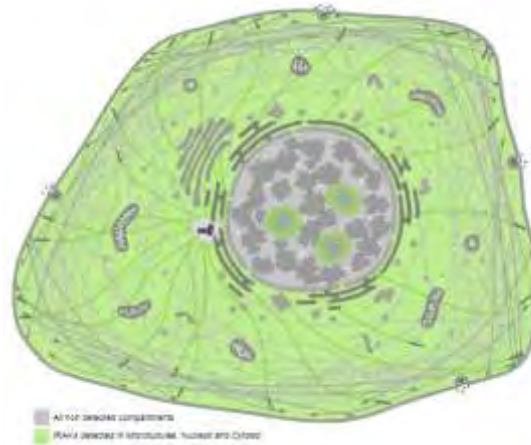




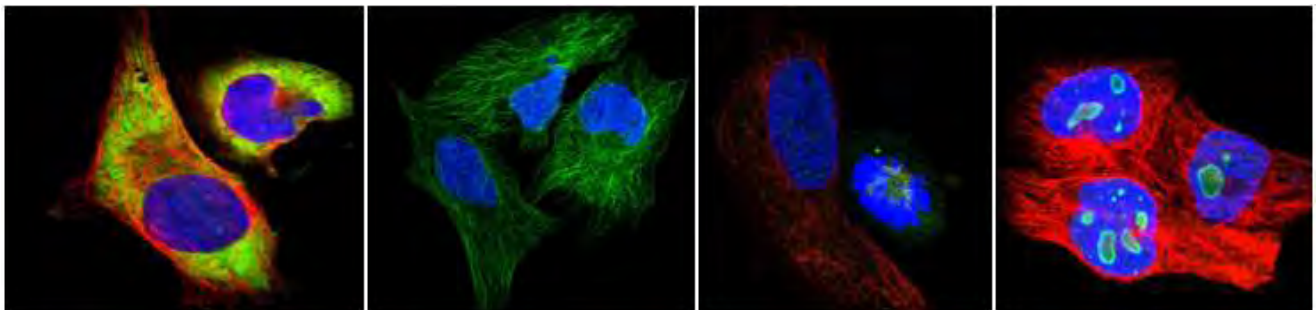
Εικόνα 8 : Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης IRAK4 [6].

Οι κινάσες σερίνης-θρεονίνης δημιουργούν έναν φωσφορικό εστέρα με την αλκοολική υδροξυλομάδα R-OH και των καταλοίπων Ser, Thr. Η καταλυτική περιοχή των κινασών σερίνης/θρεονίνης περιλαμβάνει έναν μικρό και έναν μεγάλο λοβό με το ενεργό κέντρο να σχηματίζεται στην σχισμή ανάμεσα στους δύο λοβούς. Οι δύο λοβοί συνδέονται με μία εύκαμπτη περιοχή. Ο μικρός N-τελικός λοβός αποτελείται από πέντε β-πτυχωτά φύλλα και μια αC-έλικα. Αντιθέτως ο μεγαλύτερος C-τελικός λοβός αποτελείται κυρίως από α-έλικες. Ο N-λοβός περιέχει την θέση σύνδεσης του ATP και ο C-λοβός τα καταλυτικά κατάλοιπα και μια επιφάνεια αγκυροβόλιο για το πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Το άνοιγμα και το κλείσιμο της σχισμής του ενεργού κέντρου είναι το βασικό βήμα της κατάλυσης. Τα δομικά στοιχεία που παίζουν κύριο ρόλο στην διαδικασία της κατάλυσης και στην ρύθμιση των κινασών είναι ο βρόχος πλούσιος σε Gly στον N-λοβό, η αC έλικα στον N-λοβό, ο καταλυτικός βρόχος και η περιοχή ενεργοποίησης. Οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης πραγματοποιούν ομοιοπολική φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων μέσω της μεταφοράς της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP στην OH ομάδα των καταλοίπων Ser/Thr. Η καταλυτική λειτουργία εκτελείται από την καλά συντηρημένη καταλυτική περιοχή των 270 αμινοξέων. Η περιοχή αυτή σχηματίζεται από δύο λοβούς που συνδέονται μεταξύ τους με τον εύκαμπτο σύνδεσμο. Το ενεργό κέντρο δημιουργείται από αμινοξέα και των δύο λοβών [27].

Υποκυτταρικά η πρωτεΐνη IRAK4 εντοπίζεται κυρίως στο κυτοσόλιο, στους μικροσωληνίσκους και στον πυρήνα.



Εικόνα 9: Υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης IRAK4.



(α)

(β)

(γ)

(δ)

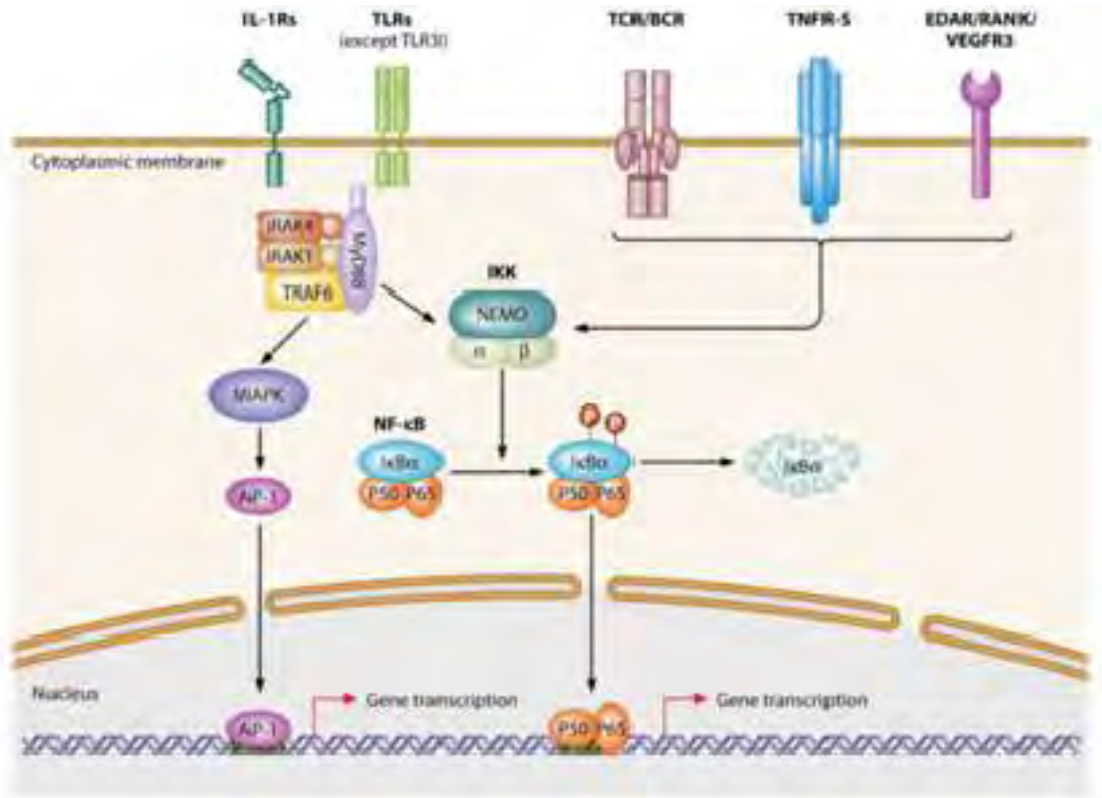
Εικόνα 10 : α) εντοπισμός IRAK4 πρωτεΐνης στο κυτοσόλιο, πράσινο: αντίσωμα, μπλε: πυρήνας, κόκκινο : μικροσωληνίσκοι, γκρι: ενδοπλασματικό δίκτυο- κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε U-2-OS (HPA003570) ,β) εντοπισμός IRAK4 πρωτεΐνης στους μικροσωληνίσκους, πράσινο: αντίσωμα, μπλε: πυρήνας, , γκρι: ενδοπλασματικό δίκτυο, μικροσωληνίσκοι - κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε U-2-OS (HPA038786), γ) εντοπισμός IRAK4 πρωτεΐνης στους μικροσωληνίσκους, πράσινο: αντίσωμα, μπλε: πυρήνας, κόκκινο : μικροσωληνίσκοι, - κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε HeLa (HPA031240),δ) εντοπισμός IRAK4 πρωτεΐνης στον πυρήνα, πράσινο: αντίσωμα, μπλε: πυρήνας, κόκκινο : μικροσωληνίσκοι, γκρι: ενδοπλασματικό δίκτυο - κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε U-251 MG (HPA 005768). [Πηγή: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198001-IRAK4/cell>]

Σε κυτταρικό επίπεδο η πρωτεΐνη IRAK4 εντοπίζεται κυρίως στα κύτταρα της μυελικής σειράς όπως είναι τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και άλλα. Σε επίπεδο οργάνων έχει βρεθεί μέσω αναλύσεων με Northern blots σε διάφορα δείγματα, έκφραση της πρωτεΐνης IRAK4 κυρίως στα νεφρά και στο ήπαρ. Μέσω ανάλυσης με RT-PCR ανιχνεύθηκαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης σε ένα μεγάλο εύρος ιστών [23].

2.3 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ ΤΟ IRAK4

Αρχικά υπάρχει σύνδεση των TLR υποδοχέων με τους συνδέτες τους. Η σύνδεση αυτή επιστρατεύει τα ενδοκυττάρια μόρια MyD88 μέσω των μορίων TIRAP. Η ενεργοποιημένη MyD88 αλληλεπιδρά με την κινάση σερίνης θρεονίνης IRAK4. Με την σειρά της, η IRAK4 ενεργοποιεί την IRAK1 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση του συμπλόκου από την MyD88 και την αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη TRAF6 (είναι μια E3 λιγάση της ουβικουΐτινης). Επόμενο βήμα είναι η αλληλεπίδραση του παράγοντα TRAF6 με δύο ένζυμα, τα Ubc13 και Uev1A και η ενεργοποίηση των παραγόντων TAB1,2,3 οι οποίοι με την σειρά τους ενεργοποιούν τον παράγοντα TAK1. Ο τελευταίος φωσφορυλιώνει τις κινάσες IκB (IKK) και MAP (MAPK). Η IκB κινάση είναι αναστολέας του NF-κB, ο οποίος είναι βασικός ρυθμιστής της μεταγραφής του DNA. Ενεργοποίηση της IκB κινάσης έχει ως συνέπεια την αλληλεπίδραση των IKK-α και IKK-β με τον παράγοντα NEMO και τελικά την φωσφορυλίωση του παράγοντα IκB και την αποδόμησή του από το σύστημα ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος. Απόρροια των παραπάνω είναι η απελευθέρωση του συμπλέγματος NF-κB και η είσοδος του στον πυρήνα του κυττάρου. Η είσοδος αυτή συνεπάγεται με την ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8. Μέσω αυτού του μονοπατιού ενεργοποιείται όχι μόνο η κινάση IκB αλλά και η MAP κινάση, η οποία με την σειρά της θέτει σε λειτουργία τον παράγοντα AP-1. Ο AP-1 συμβάλλει και αυτός με την σειρά του στην μεταγραφή γονιδίων κυτταροκινών, οι οποίες επάγουν την φλεγμονή. Η παραπάνω διαδικασία

οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF- κ B μέσω του κλασικού και όχι του εναλλακτικού μονοπατιού. Όλα τα παραπάνω απεικονίζονται με σαφήνεια στο σχήμα που ακολουθεί [12].



Εικόνα 11: Απεικόνιση του μονοπατιού που συμμετέχει η κινάση IRAK4[12].

2.4 IRAK4 ΚΑΙ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

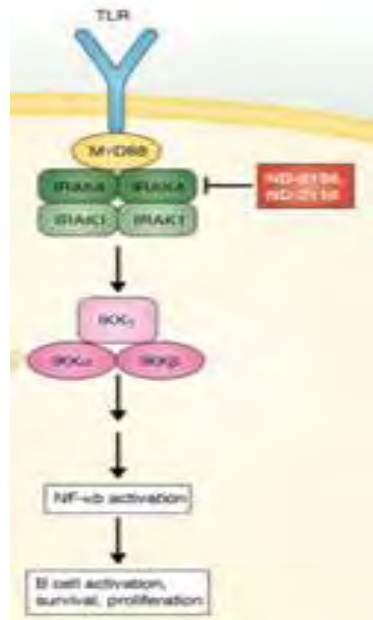
Ενεργές μεταλλάξεις στο MyD88 (L265P) έχουν εμπλακεί σε μια μεγάλη ποικιλία λευχαιμιών στις οποίες περιλαμβάνεται το Diffuse large B cell lymphoma (ABC-DLBCL), το λέμφωμα Burkitt, η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και η Waldenström μακροσφαιριναιμία,. Συνεργιστικές επιδράσεις οι οποίες αφορούν την αναστολή της IRAK4 και την παρεμπόδιση της μεταγωγής σήματος στα B-κύτταρα έχειδειχθεί ότι μειώνουν την βιωσιμότητα των κυττάρων, που προέρχονται από το ABC-DLBCL λέμφωμα καθώς επίσης αναστέλλουν και την ανάπτυξη στερεών όγκων. Έχειδειχθεί ότι κυτταρικές σειρές μελανώματος εκφράζουν υψηλά επίπεδα IRAK4. Όταν χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός βινμπλαστίνης και ενός αναστολέα του IRAK4 παρατηρήθηκε αναστολή της αύξησης του όγκου [1][22][14].

Εκτός από το μελάνωμα έχειδειχθεί ότι η πρωτεΐνη IRAK4 σχετίζεται και με τον καρκίνο του μαστού. Πιο συγκεκριμένα, το rs4251545 SNP του γονιδίου που κωδικοποιεί την IRAK4, είναι μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της αλανίνης (Ala) σε θρεονίνη (Thr) στην θέση 428. Η προαναφερθείσα μετάλλαξη είναι πιθανό να αυξάνει τα επίπεδα κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού τροποποιώντας τα επίπεδα έκφρασης ή την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IRAK4, ή την αλληλεπίδραση με ανοδικούς προσαρμοστές (όπως ο MyD88) και/ή καθοδικές κινάσες (όπως οι IRAK1 και IRAK2) και τέλος με λιγάσες (όπως ο παράγοντας TRAF6). Όλοι οι Toll-like υποδοχείς εκτός από τον TLR3 έχειδειχθεί ότι επηρεάζουν την πρόοδο του καρκίνου του μαστού εμπλέκοντας την πρωτεΐνη IRAK4 ως ‘συνεργό’. Τα παραπάνω συμπεράσματα προέκυψαν από μια μελέτη, η οποία διεξήχθη σε Αфро-Αμερικανίδες ασθενείς [28].

Επιπρόσθετα, αναστολή της κινάσης IRAK4 μειώνει την ενεργότητα του NF-κΒ, την ανεξάρτητη από προσμίξεις ανάπτυξη και την έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών από κύτταρα παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος ενώ προωθείται και η απόκριση του ασθενούς στην χημειοθεραπεία [17][18].

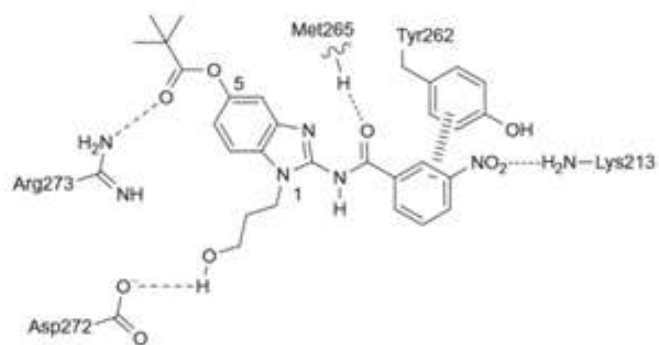
2.5 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ IRAK4

Σε προκλινικές μελέτες έχουν μελετηθεί αναστολείς της πρωτεΐνης IRAK4 όσον αφορά αυτοάνοσες ασθένειες καθώς και λεμφώματα των Β-κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα έχουν χαρακτηριστεί δύο αναστολείς, οι ND-2158 και ND-2110, οι οποίοι προσδένονται στην ATP κοιλότητα της IRAK4 πρωτεΐνης αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την δράση της ως κινάση. Τα δύο αυτά μόρια παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για την IRAK4. Σε πειράματα που διεξήχθησαν σε κυτταρικές σειρές DLBCL λεμφώματος, η δράση του ND-2158 οδήγησε σε μείωση της αύξησης του όγκου [9].



Εικόνα 12 : Αναστολείς IRAK4 [9].

Εκτός όμως από τους παραπάνω αναστολείς και άλλες ερευνητικές ομάδες ασχολήθηκαν με την εύρεση αναστολέων για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών, ανήκουν στις βενζιμιδαζόλες, στις θειαζόλες καθώς και σε άλλες κατηγορίες [22].



Εικόνα 13 : Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης IRAK4 με τον αναστολέα 4, ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των βενζιμιδαζολών [22].

3.ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Η αδυναμία του ανοσιακού συστήματος να αντιμετωπίσει τις λοιμώξεις χαρακτηρίζεται ως ανοσοανεπάρκεια. Οι ανοσοανεπάρκειες διακρίνονται στις πρωτοπαθείς και τις δευτεροπαθείς, οι οποίες είναι και περισσότερο διαδεδομένες. Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες είναι κληρονομικά νοσήματα τα οποία ανήκουν στην ομάδα σπάνιων νοσημάτων και είναι αποτέλεσμα απουσίας ή δυσλειτουργίας μίας ή περισσότερων ανοσιακών παραμέτρων. Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες διακρίνονται σε :

- Ανεπάρκεια των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.
- Ανεπάρκεια της φαγοκυτταρικής λειτουργίας (σύνδρομο Chediak-Higashi, η χρόνια κοκκιωματώδης νόσος και η ανεπάρκεια του συστήματος της μυελοϋπεροξειδάσης).
- Ανεπάρκεια των παραγόντων του συμπληρώματος (ανεπάρκεια του αναστολέα της C1-εστεράσης του συμπληρώματος).
- Ανεπάρκεια της χυμικής ανοσίας (φυλοσύνδετη αγαμμασφαιριναιμία, η εκλεκτική ανεπάρκεια κάποιας τάξης αιμοσφαιρίνης και η παροδική υπογαμμασφαιριναιμία της παιδικής ηλικίας).
- Ανεπάρκεια της κυτταρικής ανοσίας [σύνδρομο DiGeorge, η ανεπάρκεια ενζύμων απαμινάση της αδενοσίνης (ADA) και νουκλεοσιδική φωσφορυλάση (PNP), το σύνδρομο Wiskott-Aldrich και η τηλαγγειεκτασική αταξία] [31].

3.1 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ IRAK4 (IRAK4 Deficiency)

3.1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Στην κατηγορία των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών συγκαταλέγεται και η ανεπάρκεια IRAK4 ή αλλιώς IRAK4 Deficiency. Η ανεπάρκεια αυτή οδηγεί σε μολύνσεις από μια ομάδα βακτηρίων που είναι γνωστή ως πυογόνα βακτήρια [5]. Υπεύθυνα για την πλειονότητα των μολύνσεων είναι τα *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* [30]. Πιο συνήθεις είναι οι λοιμώξεις από Gram θετικά βακτήρια και σπανιότερα από Gram αρνητικά βακτήρια [11][8]. Είναι μια πολύ σπάνια νόσος με συχνότητα <1/1.000.000. Η IRAK4 ανεπάρκεια είναι ένα νόσημα το οποίο κληρονομείται με σωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα, κάτι το οποίο σημαίνει ότι ο ασθενής θα πρέπει να εμφανίζει μεταλλάξεις στο γονίδιο και στα δύο αλληλόμορφα [5][4]. Οι γονείς του ασθενούς είναι φορείς με βλάβες μόνο στο ένα αλληλόμορφο ενώ συνήθως δεν εμφανίζουν τα συμπτώματα της νόσου. Επιπρόσθετα, τα B,T και NK κύτταρα από ασθενείς με ανεπάρκεια IRAK4 δεν αποκρίνονται στην ενεργοποίηση των TLR υποδοχέων [13][7]. Εκτός από τα παραπάνω, ινοβλάστες από τους ασθενείς δεν αποκρίνονται στην διέγερση από IL-1β [22]. Η συγκεκριμένη ανοσοανεπάρκεια εμφανίζεται κυρίως κατά την παιδική ηλικία ενώ ο αριθμός των περιστατικών που οφείλονται σε βακτηριακές λοιμώξεις μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Πιο συγκεκριμένα, δεν έχουν αναφερθεί θάνατοι μετά την ηλικία των οκτώ ετών και μη διεισδυτικές μολύνσεις μετά την ηλικία των δεκατεσσάρων ετών [10].

3.1.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Τα άτομα τα οποία νοσούν από ανεπάρκεια IRAK4 εμφανίζουν συχνές και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις. Πιο συγκεκριμένα, τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά είναι η μηνιγγίτιδα, η σηψαιμία, η αρθρίτιδα, η οστεομυελίτιδα καθώς και η δημιουργία κύστεων σε διάφορα όργανα [7]. Σημαντικό είναι επίσης ότι ασθενείς με ανεπάρκεια IRAK4 παρουσιάζουν ουδετεροπενία κατά την διάρκεια της λοίμωξης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα άτομα που νοσούν, δεν παρουσιάζουν υψηλό πυρετό τις πρώτες μέρες της λοίμωξης ακόμα και αν η μόλυνση είναι αρκετά σοβαρή.

3.1.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Τα άτομα, τα οποία πάσχουν από IRAK4 Deficiency δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των λευκοκυττάρων τους. Το μόνο χαρακτηριστικό είναι ότι δεν υπάρχει αύξηση της CRP ή η αύξηση αυτής είναι ελάχιστη [5]. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα του αίματος δεν παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α και INF-γ σε απόκριση σε αγωνιστές των IL-1β, IL-18 και Toll-like υποδοχέων [8]. Εκτός όμως από τα παραπάνω υπάρχουν και ασθενείς με ανεπάρκεια IRAK4, οι οποίοι παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B κυττάρων. Ο πληθυσμός αυτός φυσιολογικά αυξάνει τις αποκρίσεις των T-ανεξάρτητων αντισωμάτων ενάντια στα βακτηριακά αντιγόνα [10][3].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι ασθενείς με ανεπάρκεια IRAK4 δεν εντοπίζονται σε μια σε συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή ενώ είναι μια νόσος ανεξάρτητη φύλου. Πληθώρα άρθρων έχουν βασιστεί σε μελέτες ασθενών, οι οποίοι προέρχονται από την Ευρώπη [Γαλλία, Ουγγαρία, Σλοβενία, Ισπανία], την Ασία [Σαουδική Αραβία, Τουρκία, Ισραήλ] από στην Αμερική και τον Καναδά ενώ έχουν παρατηρηθεί περιστατικά στην Αυστραλία και στην Ιαπωνία.[11]



Εικόνα 14: Γεωγραφική κατανομή ασθενών με IRAK4 Deficiency[11].

3.1.4 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ IRAK4 ΚΑΙ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Μεταλλάξεις στο γονίδιο IRAK4 οδηγούν σε πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες (IRAK4 ανεπάρκεια). Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πληθώρα μεταλλάξεων στο συγκεκριμένο γονίδιο με κάποιες από αυτές να παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί, με βάση πληροφορίες από την βάση δεδομένων OMIM (Κωδικός OMIM : 607676) [29].

<u>Μετάλλαξη</u>	<u>Εξόνιο /Ιντρόνιο</u>	<u>Χαρακτηρισμός</u>	<u>Συχνότητα εμφάνισης</u>
Μετάλλαξη 0001	Εξόνιο 7	g.23791delT ,c.821delT, p.Leu274Pro fs (stop codon at 287)	delT=0.00002(2/125568), TOPMED
Μετάλλαξη 0002	Εξόνιο 8	g.24295C>T, c.877C>T, p.Gln293Ter, rs121908002	T=0.00024 (58/246156), GnomAD
Μετάλλαξη 0003	Εξόνιο 5	g.19098_19099delAC, p.Thr208Asnfs,rs1421444086	delCA=0.00002 2/125568, TOPMED
Μετάλλαξη 0004	Εξόνιο 2	g.14202C>T, c.34C>T.p.Arg12Cys, rs377584435	T=0.00001 1/125568, TOPMED
Μετάλλαξη 0005	Ιντρόνιο 7	g.23806G>T, c.831+5G>T , rs758539498	T=0.00001 1/125568, TOPMED

Πίνακας 1 : Ενδεικτικές μεταλλάξεις στο γονίδιο IRAK4 με βάση την OMIM.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο IRAK4 εντοπίζονται τόσο στην επικράτεια ‘θανάτου’ (DD), όσο και στην επικράτεια κινάσης (KD). Συνηθέστερες είναι οι μεταλλάξεις στην επικράτεια κινάσης δεδομένου ότι καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης. Οι μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας της κινάσης έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή της σηματοδότησης και κατά συνέπεια την παραγωγή IL-1, IL-6 καθώς και TNF-α.

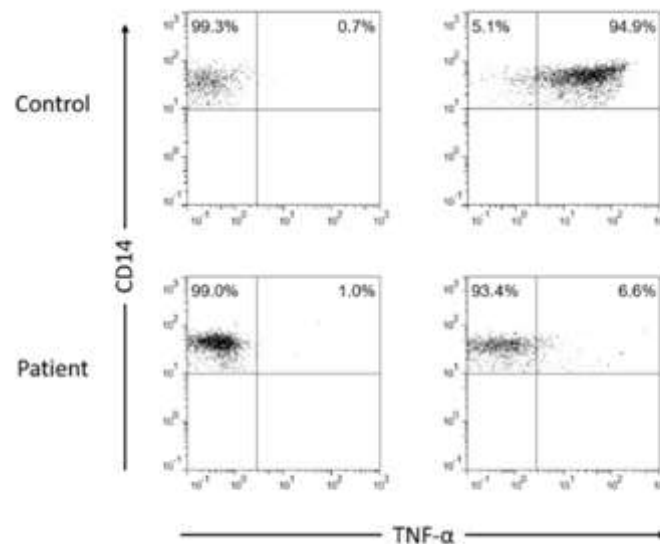
Επιπρόσθετα, μέσα από μελέτες έχειδειχθεί ότι αναστολή της δράσης της κινάσης έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων με παράγοντες όπως η IRAK1, η IRAK2 και ο MyD88. Όσον αφορά μεταλλάξεις στην επικράτεια θανάτου, άμεσο αποτέλεσμα είναι η αδυναμία σταθερών αλληλεπιδράσεων με άλλους παράγοντες εμποδίζοντας έτσι την σηματοδότηση [21].

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 1, μεταλλάξεις παρουσιάζονται όχι μόνο στις κωδικές αλλά και στις μη κωδικές περιοχές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μελέτη του Medvedev, όπου αναλύθηκε η ύπαρξη μιας βλάβης σε ιντρονική περιοχή του γονιδίου IRAK4. Πιο συγκεκριμένα ανιχνεύτηκε ένα έλλειμμα δύο νουκλεοτιδίων (cDNA 620-621 και g. 15978–15979), το οποίο λόγω μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου δημιουργεί ένα κωδικόνιο τερματισμού 36-39 νουκλεοτίδια καθοδικά. Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας πρωτεΐνης με μικρότερο μέγεθος [33]. Παρόμοια μελέτη του Hoarau και των συνεργατών του έδειξε ότι μετάλλαξη σε ιντρονική περιοχή (c.831+5G>T) οδήγησε σε παράλειψη του εξονίου 7, λόγω βλάβης κατά την διάρκεια του ματίσματος και δημιουργία κωδικονίου τερματισμού στην θέση 249 [38].

3.1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

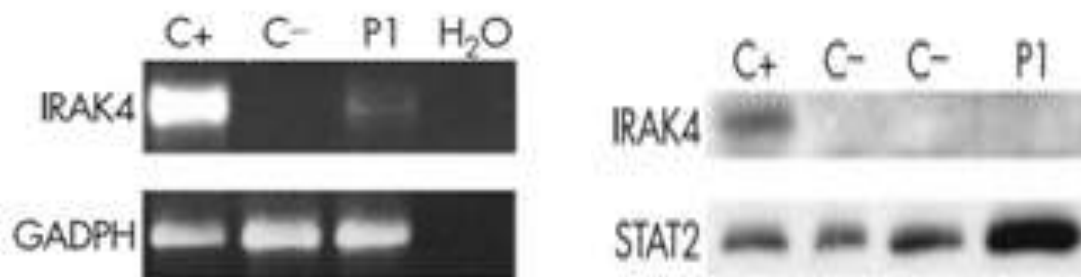
Για την διάγνωση της ανεπάρκειας IRAK4 βασικά στοιχεία αποτελούν τα κλινικά χαρακτηριστικά και ο μοριακός έλεγχος. Τα κλινικά συμπτώματα αποτελούν την πρώτη γραμμή και σε συνδυασμό με τον μοριακό έλεγχο, μέσω PCR και αλληλούχησης του γονιδίου IRAK4, μπορούν να επιβεβαιώσουν την διάγνωση της ανεπάρκειας IRAK4. Επόμενο στάδιο για την επιβεβαίωση της νόσου είναι λειτουργικές δοκιμές *in vitro*. Σημαντικό μέσο για αυτές τις δοκιμές αποτελεί η κυτταρομετρία ροής. Πιο συγκεκριμένα, η *in vitro* ενδοκυτταρική παραγωγή TNF-α στα μονοκύτταρα σε απόκριση στον LPS, ο οποίος είναι ένας προσδέτης του υποδοχέα TLR4, έχει προσδιοριστεί μέσω κυτταρομετρίας ροής σε ασθενείς με IRAK4 ανεπάρκεια. Αποτελέσματα αυτής της δοκιμασίας έδειξαν εξασθενημένη παραγωγή του TNF-α [5]. Μια άλλη λειτουργική μέθοδος όσον αφορά την ανεπάρκεια IRAK4 βασίζεται στην

ανίχνευση της διάσπασης της L-σελεκτίνης (CD62L) στην επιφάνεια των κοκκιοκυττάρων μετά από διέγερση των κυττάρων του αίματος με αγωνιστές για τους υποδοχείς TLR4 και TLR7/8 [21], [24].



Εικόνα 15 : Κυτταρομετρική ανάλυση μονοκυττάρων σε ασθενή με ανεπάρκεια *IRAK4*. [5]

Στην διεθνή βιβλιογραφία εκτός από τα βασικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση αλλά και την επιβεβαίωση της ανεπάρκειας *IRAK4* συγκαταλέγονται και μέθοδοι όπως το Western blot. Δεν είναι λίγες οι μελέτες οι οποίες αντί για DNA χρησιμοποιούν cDNA ή και RNA προκειμένου μέσω RT-PCR να μετρηθεί ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου *IRAK4*. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, για να διαπιστωθεί η ανεπάρκεια *IRAK4*, η κύρια τεχνική που χρησιμοποιείται βασίζεται στο Western blot. Πιο συγκεκριμένα μέσω αυτής της μεθόδου επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ή μη της πρωτεΐνης *IRAK4* [6].



Εικόνα 16:Αριστερά.: Έκφραση του cDNA του γονιδίου *IRAK4* σε ινοβλάστες από υγιή θετικό κοντρόλ (C+), από ινοβλάστες με ανεπάρκεια *IRAK4* (C-μετάλλαξη Q293X), και έναν ασθενή (P1). Δεξιά: Παραγωγή της πρωτεΐνης *IRAK4* σε ινοβλάστες από C+ , δύο κυτταρικές σειρές ινοβλαστών με ανεπάρκεια *IRAK4* (μεταλλάξεις 821delT και Q293X) όπως ανιχνεύθηκε με Western blot με την χρήση anti-*IRAK4* αντισώματος [6].

3.1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Μόνιμη θεραπεία της IRAK4 ανεπάρκειας δεν υπάρχει. Οι ασθενείς με ανεπάρκεια IRAK4 είναι αναγκαίο να ανοσοποιούνται με συζευγμένα και μη εμβόλια, φάρμακα για τον *S. pneumoniae*., ενώ επιβάλλεται η προληπτική αντιβιοτική αγωγή, με cotrimoxazole και πενικιλίνη V (σε περίπτωση αλλεργίας σε ένα από αυτά τα αντιβιοτικά). Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη την σοβαρότητα των βακτηριακών λοιμώξεων κατά την παιδική ηλικία καθώς και την αδυναμία παραγωγής επαρκούς τίτλου αντισωμάτων, η οποία παρατηρήθηκε σε μερικούς ασθενείς με ανεπάρκεια IRAK4, συνίσταται η ενδοφλέβια ή υποδόρια χορήγηση IgG. Η θεραπεία αυτή είναι ιδανική μέχρι τα παιδιά να φτάσουν στην ηλικία των δέκα ετών. Αυτού του είδους η προφύλαξη έχει δείχθει ότι μειώνει τα συμβάντα όπου παρουσιάζονται διεισδυτικές βακτηριακές λοιμώξεις. Οι ασθενείς με ανεπάρκεια IRAK4 συνιστάται να ξεκινήσουν παρεντερική θεραπεία με αντιβιοτικά ενάντια στα *S. pneumoniae*, *S. aureus*, και *P. aeruginosa* μόλις υπάρξει υποψία για κάποια μόλυνση ή μόλις ο ασθενής αναπτύξει ήπιο πυρετό χωρίς να ληφθούν υπόψη φλεγμονώδεις παράμετροι. Αυτό είναι ιδανικό καθώς ο ασθενής μπορεί να πεθάνει εξαιτίας ραγδαίας διεισδυτικής βακτηριακής λοίμωξης. Σημαντικό είναι εξίσου να πραγματοποιηθεί προσαρμογή της θεραπείας με αντιβιοτικά εφόσον έχει ταυτοποιηθεί το υπεύθυνο βακτήριο. [12]

4.ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση πιθανών μεταλλάξεων ή/και πολυμορφισμών στον γονίδιο IRAK4 σε ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από εμμένουσες και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις. Για το σκοπό αυτό, προτυποποιήθηκε πρωτόκολλο για την μελέτη του συνόλου της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου μέσω αλληλούχησης κατά Sanger.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα από πέντε ασθενείς οι οποίοι παρουσίαζαν υποτροπιάζουσες λοιμώξεις. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας για την νόσο, ολικό περιφερικό αίμα υγιούς ατόμου. Εκτός όμως τα δείγματα των ασθενών μελετήθηκε και δείγμα υγιούς μητέρας ασθενούς. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη προήλθαν από το Ιατρείο Ανοσοανεπαρκειών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, το οποίο αποτελεί κέντρο αναφοράς διάγνωσης και θεραπείας πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών ενηλίκων, για την Ελλάδα. Τα κλινικά στοιχεία των ασθενών παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα που ακολουθεί.

Κωδικός Ασθενούς	Φύλο	Ηλικία	Κλινικά Ευρήματα
P1	Άρρεν	31 ετών	Υποτροπιάζουσα αμυγδαλίτιδα, Αδενοειδεκτομή, Υποτροπιάζοντα επεισόδια έρπη.
P2	Άρρεν	36 ετών	Υποτροπιάζουσα αφθώδης στοματίτιδα, Ιγμορίτιδα, 1 επεισόδιο πνευμονίας, 5 φορές επέμβαση για κονδυλώματα, Υδροτανετίτιδα, Ονυχομυκητίαση.
P3	Θήλυ	49 ετών	Υποθυρεοειδισμός, Αγγειακό εγκεφαλικό (σε ηλικία 40 ετών), Πεμφιγοειδές, Δοθιήνωση, Υποτροπιάζοντα επεισόδια γενικευμένων λοιμώξεων ερπητοειδή.
P4	Θήλυ	51 ετών	Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, 1 επεισόδιο πνευμονίας, 1 επεισόδιο ουρολοίμωξης, 4 επεισόδια φαρυγγαμυγδαλίτιδας.
P5	Θήλυ	17 ετών	Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, θεραπεία με γ-σφαιρίνη, Σακχαρώδη διαβήτη, Ανοσογόνο παχυσαρκία, Νοητική υστέρηση, Αυτισμό.

Πίνακας 2 : Κλινικά Στοιχεία των ασθενών.

6.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

6.1.Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα.

Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκε το ειδικό σύστημα PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η προβλεπόμενη από τον κατασκευαστή για την απομόνωση γονιδιωματικού υλικού από εμπύρνηνα λευκοκύτταρα καθώς και από προσμίξεις (πρωτεΐνες και RNA) και ενζυμικούς αναστολείς. Πιο συγκεκριμένα σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης (eppendorf) των 1,5ml μεταφέρθηκαν 200μL από κάθε φιαλίδιο γενικής περιφερικού αίματος. Αμέσως μετά έγινε η προσθήκη 20μL πρωτεΐνάσης K, η οποία αναγνωρίζει και διασπά τον πεπτιδικό δεσμό δίπλα στην καρβοξυλομάδα των αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων και 20μL RNAάσης προκειμένου να απομακρυνθεί το RNA που υπάρχει στο δείγμα, ανάδευση και επώαση για δύο λεπτά. Σε επόμενο στάδιο προστέθηκαν 200μL διαλύματος λύσης (PureLink® Genomic Lysis/ Binding Buffer), το οποίο ενισχύει την δράση της πρωτεΐνάσης K, στοχεύοντας στην ολοκληρωτική λύση των κυττάρων και ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 55°C για είκοσι λεπτά. Μετά την επώαση προστέθηκαν 200μL αιθανόλης 96-100%, το οποίο επιτρέπει την πρόσδεση του DNA στην στήλη και ακολούθησε μεταφορά του δείγματος σε ειδική στήλη (PureLink® Spin Column). Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 10.000 (xg) στροφές για ένα λεπτό. Επόμενο βήμα, ήταν οι διαδοχικές πλύσεις με προσθήκη 500μL από τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 και φυγοκέντρωση στις 10.000(xg) στροφές για ένα λεπτό και στην συνέχεια στις 14.000 (xg) στροφές για τρία λεπτά. Σκοπός αυτών των φυγοκεντρήσεων είναι να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις και ενζυμικοί αναστολείς. Σε τελικό στάδιο, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης (eppendorf) των 1,5mL και προστίθενται 100μL διαλύματος έκλουσης (Pure Link Genomic Elution Buffer), επώαση για ένα λεπτό και φυγοκέντρωση στις 14.000(xg) στροφές για ένα λεπτό. Μετά το πέρας της διαδικασίας, το δείγμα του DNA φυλάσσεται προσωρινά στους 2 - 8°C ή για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -20°C.

6.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

6.2.1. PCR για την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου *IRAK4*.

Στην συγκεκριμένη μελέτη ως βασική τεχνική χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμέρασης (PCR). Η PCR βασίζεται στην ενζυμική ενίσχυση, η οποία οριοθετείται από ένα ζεύγος εκκινητών. Τα βασικά στάδια της PCR είναι τρία, η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η επιμήκυνση. Οι εκκινητές που απαιτούνταν για την ενίσχυση του γονιδίου δημιουργήθηκαν με βάση τα προγράμματα Oligo 6 και Primer Blast. Στους πίνακες που παρουσιάζονται παρακάτω, αναγράφονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, το μήκος τους καθώς και το μήκος του προϊόντος που ενισχύουν.

Εξόνιο/Εξόνια	Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	Μήκος (bp)	Μήκος (bp) προϊόντος PCR
Εξόνιο 2	F: 5'-TCCTCCGATTTTATTGCTATT-3' R: 5'-CACAGTATTAGCCCTATTGACA-3'	22 22	618bp
Εξόνια 3-4	F: 5'-AACCGTGAGCCAAATTAATA-3' R: 5'-TGTCCTATTGCCTCTAATCACT-3'	21 22	1456bp
Εξόνια 5-6	F: 5'-AGTGTTTCAGAGGGTAGGATCA-3' R: 5'-ACATCACTAGTTCATGGCATAC-3'	21 22	1417bp
Εξόνιο 7	F: 5'-TGGGCAACAGAGTTAGACC-3' R: 5'-CACCTAATAAAATGGCAAC-3'	19 19	573bp
Εξόνιο 8	F: 5'-TGCTATAACATCATCTTCAGTTG-3' R: 5'-ACAACCTAATTCCATAAGGCAA-3'	23 22	497bp
Εξόνιο 9	F: 5'-ACTTTAGGCTTTTATGATGC-3' R: 5'-TCATAAAGACAGATGGCAAG-3'	20 20	598bp
Εξόνιο 10	F: 5'-AAGTTATCCTCCCACATC-3' R: 5'-AGTTCTATTCTCATTTTACCCA-3'	18 22	422bp
Εξόνια 11-12	F: 5'-CTGCCAGCCTTCCAAG-3' R: 5'-GGTAGGGCTAAGTGTTGAT-3'	16 19	763bp

Πίνακας 3: Εκκινητές για την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου *IRAK4*.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την διεξαγωγή των πειραμάτων στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο Taq πολυμεράσες, η DFS και η My Taq πολυμεράση. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η σύσταση των διαλυμάτων να διαφέρει. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η σύσταση των μειγμάτων της αντίδρασης PCR ανάλογα με την πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά.

<u>PCR mix for DFS polymerase</u>		<u>PCR mix for MyTaq polymerase</u>	
	μl		MI
10x reaction buffer (for DFS)	50	5x reaction buffer (for MyTaq)	96
MgCl ₂ (100 mM)	7.5	Forward primer (20pmol/μl)	17
dNTPs (2.5 mM)	40	Reverse primer (20pmol/μl)	17
Forward primer (50 pmol/μl)	10	dH ₂ O	225
Reverse primer (50 pmol/μl)	10	Final volume	355
dH ₂ O	242.5		
Final volume	360		

Πίνακας 4: Σύσταση μειγμάτων για τις αντιδράσεις PCR με My Taq και DFS πολυμεράση.

Σε κάθε αντίδραση PCR συμπεριλήφθηκε και ένα σωληνάριο, όπου αντί για γενετικό υλικό υπήρχε νερό, ως αρνητικός μάρτυρας («no-DNA control») προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30μl όπου 22μL ήταν το mix για την αντίδραση, 6μL το mix για την εκάστοτε πολυμεράση και 2μL το γενετικό υλικό (DNA). Ακολούθησε ανάλυση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% και για την απεικόνιση τους εκτέθηκαν σε μηχανήμα υπεριώδους ακτινοβολίας. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται με λεπτομέρειες οι συνθήκες στις οποίες διεξήχθη η PCR για την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου IRAK4.

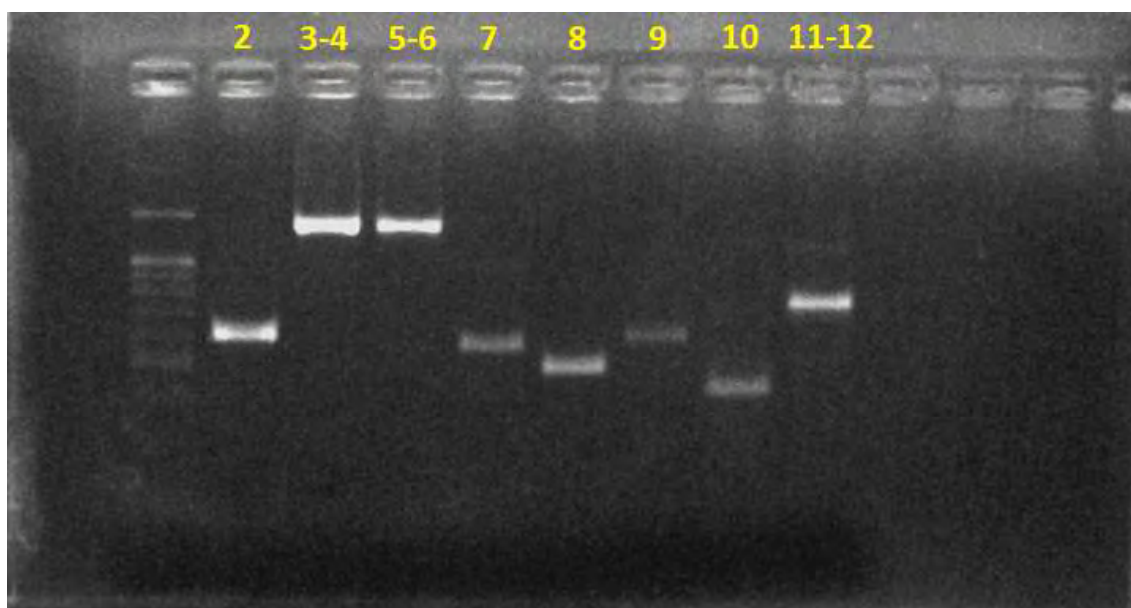
Στάδιο		Εξόνιο											
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	Θερμοκρασία	94°C											
	Διάρκεια	2 min											
Αποδιάταξη (Denaturation)	Θερμοκρασία	94°C											
	Διάρκεια	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s
	Θερμοκρασία	52°C	54°C	54°C	52°C	52°C	58°C	55°C	55°C	53°C	59°C	59°C	
Υβριδισμός (Annealing)	Θερμοκρασία												
	Διάρκεια	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s
Επέκταση (Extension)	Θερμοκρασία	72° C											
	Διάρκεια	1min	1,3min	1,3min	1,3min	1,3min	1,3min	1min	1min	1min	1min	1min	1min
Τελική επέκταση (Final extension)	Θερμοκρασία	72°C											
	Διάρκεια	5min											
Κύκλοι		32	32	32	32	32	30	30	30	30	30	30	

Πίνακας 5 : Συνθήκες PCR για την ενίσχυση των 11 εξονίων του γονιδίου IRAK4.

6.2.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε γέλη αγαρόζης.

Για να ελεγχθεί το μέγεθος των προϊόντων της PCR καθώς και η καθαρότητα τους ακολουθήθηκε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%(w/v). Για τον εντοπισμό των προϊόντων στο πήκτωμα προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο, μια φθορίζουσα χρωστική η οποία παρεμβάλλεται στο DNA και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 5μL από το προϊόν της PCR και 5μL διαλύματος χρωστικής (Μπλε της βρωμοφαινόλης σε διάλυμα γλυκερόλης, H₂O και EDTA) τα οποία και αναμείχθηκαν. Το κάθε μείγμα τοποθετήθηκε

στα βοθρία της γέλης και ηλεκτροφορήθηκε για τριάντα λεπτά στα 120V και 400mA. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακών βαρών ο 100 bp DNA Ladder (Gene On). Η φωτογράφιση της γέλης έγινε σε υπεριώδη ακτινοβολία με την βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Uvitec). Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται όλα τα εξόνια του γονιδίου *IRAK4* που μελετήθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%w/v για 30 λεπτά στα 120V και 400mA.



Εικόνα 17 : Ηλεκτροφόρηση των εξονίων του γονιδίου *IRAK4*.

6.2.3.Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.

Ο καθαρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ειδικού συστήματος EXTRACT ME[®] DNA CLEAN-UPKIT (blirt DNA GDANSK). Πιο συγκεκριμένα μέσω του καθαρισμού επιτυγχάνεται η απομάκρυνση όλων εκείνων των στοιχείων που περιέχονταν στο μείγμα για την αντίδραση της PCR (εκκινητές, νουκλεοτίδια, άλατα και ένζυμα). Αρχικά στο tube της PCR (το οποίο περιείχε 25 μ L προϊόντος) τοποθετήθηκαν 50 μ L CB Buffer και ακολούθησε ανάδευση. Επόμενο βήμα ήταν η μεταφορά του μείγματος σε στήλη και η φυγοκέντρωση για τριάντα δευτερόλεπτα στις 11.000 στροφές

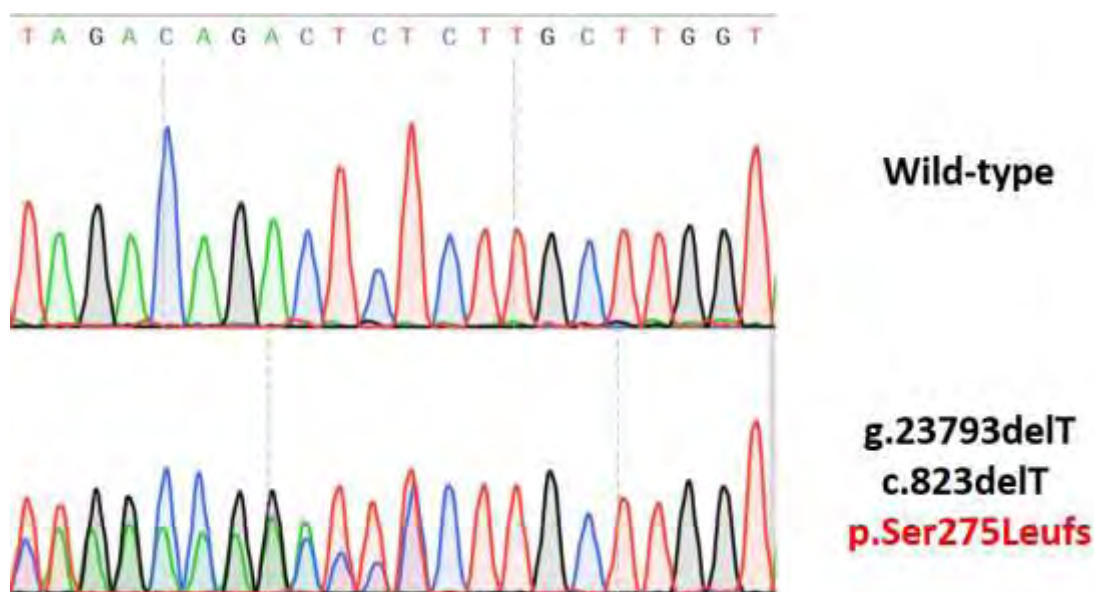
(xg). Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απορρίφθηκε το collection tube και η στήλη μεταφέρθηκε σε ένα νέο collection tube. Στην συνέχεια, ακολουθήθηκαν δύο διαδοχικές πλύσεις με την προσθήκη 700μL CW Buffer, το οποίο περιέχει αιθανόλη και πραγματοποιήθηκαν δύο φυγοκεντρήσεις για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 στροφές (xg) και μια τελική φυγοκέντρωση χωρίς την προσθήκη κάποιου άλλου διαλύματος για τρία λεπτά στις 11.000 στροφές (xg). Σκοπός των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων ήταν η απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από την στήλη καθώς παρουσία αυτής μειώνεται η απόδοση της έκλουσης ενώ επίσης δημιουργούνται παρεμβολές σε κάποιες ενζυματικές αντιδράσεις. Στο τελευταίο στάδιο μεταφέρθηκε η στήλη σε σωληνάριο φυγοκέντρωσης (eppendorf) των 1,5mL και προστέθηκαν 30μL διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer) και μετά από επώαση ενός λεπτού ακολούθησε φυγοκέντρωση για ένα λεπτό στις 11.000 στροφές (xg). Το σωληνάριο της φυγοκέντρωσης, το οποίο περιέχει το DNA απαλλαγμένο από διάφορες προσμίξεις αποθηκεύεται στους -20°C για μελλοντική χρήση.

6.2.4 Ανάλυση της αλληλουχίας

Τα δείγματα στάλθηκαν προς ανάλυση προκειμένου να προσδιοριστεί η αλληλουχία του γονιδίου. Μέσω αυτού του τρόπου μπορούν να γίνουν γνωστές τυχόν μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί στο γονίδιο που μελετάται. Η κατευθυνόμενη αλληλούχηση γίνεται με την μέθοδο Sanger. Η μέθοδος Sanger βασίζεται στην ικανότητα των τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοσιδίων, δηλαδή τροποποιημένων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων χωρίς την 3' OH (3'υδροξυλομάδα) να σταματούν την επιμήκυνση ενός κλώνου DNA. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που είχαν δημιουργηθεί για την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου IRAK4 . Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων αλληλούχησης έγινε με χρήση του ελεύθερου λογισμικού Snap GeneViewer. Η σύγκριση της εκάστοτε αλληλουχίας έγινε με βάση την αλληλουχία αγρίου τύπου του μεταγράφου ENST00000613694.4, που παρέχεται από τη βάση ensemble.org, ενώ η περιγραφή των μεταλλάξεων/πολυμορφισμών με χρήση της βάσης dbSNP.

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τους πέντε ασθενείς που μελετήθηκαν ανιχνεύθηκε στην ασθενή P5 η μετάλλαξη g.23793delT, c.823delT, p.Ser275Leufs*13, rs1344157494. Οι υπόλοιποι ασθενείς που μελετήθηκαν παρουσίασαν αγρίου τύπου (wildtype) αλληλουχία, χωρίς πολυμορφισμούς και μεταλλάξεις. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη, αφορά την έλλειψη μιας θυμίνης (T) στην θέση 23793, η οποία οδηγεί σε μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου. Το αποτέλεσμα είναι η αμινοξική αντικατάσταση της σερίνης (Ser) με την λευκίνη (Leu) στην θέση 275. Η προαναφερθείσα αλλαγή οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης, καθώς δημιουργείται κωδικόνιο τερματισμού 13 αμινοξέα μετά την αντικατάσταση. Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζεται η μετάλλαξη που ανιχνεύθηκε στην ασθενή P5 σε κατάσταση ετεροζυγωτίας.



Εικόνα 18 :Σχηματική απεικόνιση της μετάλλαξης στο εξόνιο 7 του γονιδίου IRAK4 που ανιχνεύθηκε σε μητέρα και κόρη.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι επίκτητη (de novo), ή έχει κληρονομηθεί από κάποιο μέλος της οικογένειας, αναλύθηκε γενετικό υλικό από την μητέρα της ασθενούς. Η ανάλυση έδειξε ότι η μητέρα της ασθενούς P5 έφερε την ίδια μετάλλαξη. Το συμπέρασμα που προέκυψε από τα παραπάνω, ήταν ότι η εν λόγω μετάλλαξη είχε κληρονομηθεί από την μητέρα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, για την εκδήλωση της IRAK4 ανεπάρκειας είναι απαραίτητη η ύπαρξη παθογόνων μεταλλάξεων σε ομοζυγωτία ή διπλή ετεροζυγωτία, καθώς η συγκεκριμένη νόσος κληρονομείται με σωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Με βάση τα παραπάνω και τα δικά μας δεδομένα προκύπτει το συμπέρασμα ότι, η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν είναι παθογόνος, δεδομένου ότι η μητέρα της ασθενούς είναι υγιής.

Στην διεθνή βιβλιογραφία, η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει καταγραφεί μόνο μια φορά. Πιο συγκεκριμένα, ο *AlMousa* και οι συνεργάτες του, μελέτησαν με την βοήθεια NGS (Next Generation Sequencing-Αλληλούχηση νέας γενιάς) 261 ασθενείς με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες. Ένας εκ των ασθενών παρουσίασε σήψη λόγω πνευμονιόκοκκου και εμφάνιζε την συγκεκριμένη μετάλλαξη σε ομοζυγωτική κατάσταση (NM_001145258: exon5: c.451_451delT, p.S151LfsX13) [34].

Πολλές ανοσοανεπάρκειες, οι οποίες είναι σπάνια σύνδρομα, έχειδειχθεί ότι είναι πολυπαραγοντικά νοσήματα, όπου υφίσταται συρροή γενετικών αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων [37]. Όσον αφορά την ασθενή P5, στην οποία ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη, είναι πολύ πιθανό εκτός από την συγκεκριμένη βλάβη στο γονίδιο IRAK4 να υπάρχουν βλάβες και σε άλλα ανοσογονίδια, οι οποίες δρώντας συνεργιστικά οδήγησαν στην εκδήλωση αυτού του κλινικού φαινοτύπου. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η ασθενής παρουσίαζε, εκτός από υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ανώτερου αλλά και κατώτερου αναπνευστικού, νοητική υστέρηση, παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη και αυτισμό. Η μητέρα της ασθενούς, που έφερε την εν λόγω βλάβη, είναι υγιής.

Επομένως, είναι πιθανό η ασθενής P5 να έχει κληρονομήσει μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια από τον πατέρα της.

Ανάλογο περιστατικό έχει μελετηθεί και δημοσιευθεί από το εργαστήριό μας, όπου ασθενής με ανοσοανεπάρκεια κληρονόμησε διακριτές γενετικές βλάβες σε διαφορετικά γονίδια από τους γονείς του, οι οποίοι ήταν ασυμπτωματικοί [35], ενώ υπάρχει πληθώρα ανάλογων δημοσιεύσεων στην διεθνή βιβλιογραφία.

Μελλοντικά είναι αναγκαίο να διερευνηθούν και άλλα γονίδια προκειμένου να διευκρινιστεί περαιτέρω η γενετική βάση που σχετίζεται με την εμφάνιση του συγκεκριμένου κλινικού φαινοτύπου. Επιπρόσθετα, σε επόμενο στάδιο πρέπει να μελετηθεί εάν η εν λόγω βλάβη στο γονίδιο *IRAK4* μπορεί να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης αλλά και την λειτουργία της πρωτεΐνης. Η λειτουργική μελέτη είναι επιβεβλημένη ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα αναφορικά με τον επαρκή ή μη ρόλο της στην σηματοδότηση του μονοπατιού των TLR και κατά συνέπεια στην επαγωγή της φλεγμονής.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chaudhary Divya et.al. 'Recent Advances in the Discovery of Small Molecule Inhibitors of Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4 (IRAK4) as a Therapeutic Target for Inflammation and Oncology Disorders'. *Journal of Medicinal Chemistry*.2015.58. 96–110. [dx.doi.org/10.1021/jm5016044](https://doi.org/10.1021/jm5016044) |.
2. Davidson Donald J., 'IRAK-4 in Human Myeloid and Non-Myeloid Cells Post-Transcriptional TLR/IL-1R Responses and Characterization of Defective Mutation (Q293X): Rapid Detection', *J Immunol* 2006;177:8202-8211,doi: 10.4049/jimmunol.177.11.8202.
3. Frans G. et.al , 'PID in Disguise: Molecular Diagnosis of IRAK-4 Deficiency in an Adult Previously Misdiagnosed With Autosomal Dominant Hyper IgE Syndrome', *J ClinImmunol* (2015) 35:739–744, DOI 10.1007/s10875-015-0205-x.
4. Gobin Karina et.al, 'IRAK4 Deficiency in a Patient with Recurrent Pneumococcal Infections : Case Report and Review of the Literature', *Front. Pediatr.* 5:83. doi: 10.3389/fped.2017.00083
5. Kanegane Hirokazu et.al, 'Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases'. *Allergology International* 67 (2018) 43-54 <http://dx.doi.org/10.1016/j.alit.2017.06.003>.
6. Ku Cheng-Lung et.al, 'IRAK4 and NEMO mutations in otherwise healthy children with recurrent invasive pneumococcal disease', *J Med Genet* 2007;44:16–23. doi: 10.1136/jmg.2006.044446.
7. Ku Cheng-Lung et.al , 'Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity', *JEM* © The Rockefeller University Press Vol. 204, No. 10October 1, 2007 2407-2422, www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20070628.
8. Kun Yang et.al, 'Human TLR-7,-8- and -9- Mediated Induction of IFN α/β and λ Is IRAK-4 Dependent and Redundant for Protective Immunity to Viruses',*Immunity*,(2005), Vol. 23, 465–478, DOI 10.1016/j.immuni.2005.09.016
9. Küppers Ralf, 'IRAK4 inhibition to shut down TLR signaling in autoimmunity and MyD88-dependent lymphomas', *The Journal of Experimental*

- Medicine,(2015), <http://doi.org/10.1084/jem.21213insight1>, Kelly, P.N., et al. 2015. *J. Exp. Med.* <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20151074>.
10. Maglione Paul J. et.al, , 'IRAK-4 and MyD88 deficiencies impair IgM responses against T-independent bacterial antigens', *Blood*, 4 December 2014 x Volume 124, Number 24, DOI 10.1182/blood-2014-07587824.
 11. Picard Capucine et.al, 'Clinical Features and Outcome of Patients With IRAK-4 and MyD88 Deficiency', *Medicine* 2010;89: 403Y425.
 12. Picard Capucine et.al, 'Infectious Diseases in Patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I κ B α Deficiency', *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, p. 490–497 Vol. 24, No. 3, doi:10.1128/CMR.00001-11.
 13. Picard Capucine et.al. 'Pyogenic Bacterial Infections in Humans with IRAK-4 Deficiency'. *Science*. 2003. Vol. 29. 10.1126/science.1081902.
 14. Rhyasen G W et.al, ' IRAK signalling in cancer', *British Journal of Cancer* (2015) 112, 232–237 | doi: 10.1038/bjc.2014.513.
 15. Suzuki Nobutaka et.al, 'A Critical Role for the Innate Immune Signaling Molecule IRAK-4 in T Cell Activation', *Science*, Vol.311, 2006,DOI: 10.1126/science.1124256
 16. Suzuki Nobutaka et.al, ' IRAK-4 – a shared NF- κ B activator in innate and acquired immunity', *TRENDS in Immunology*, 2006, Vol.27, No. 12, doi:10.1016/j.it.2006.10.003.
 17. Zhang Daoxiang et.al, 'Constitutive IRAK4 Activation Underlies Poor Prognosis and Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Clinical Cancer Research*, 2017, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1121.
 18. Zhang Daoxiang et.al, 'Tumor–Stroma IL1b-IRAK4 Feedforward Circuitry Drives Tumor Fibrosis,Chemoresistance,and Poor Prognosis in Pancreatic Cancer', *Cancer Research*, 2018, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1366.
 19. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IRAK4&keywords=IRAK4>
 20. Kuby et.al, ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2^η Έκδοση.
 21. Picard Capucine et.al, 'Inherited human IRAK-4 deficiency: an update',*Immunol Res* (2007) 38:347–352 DOI 10.1007/s12026-007-0006-2.
 22. Hynes Jr. John et.al, 'Advances in the Discovery of Small-Molecule IRAK4 Inhibitors', *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Volume 49,<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800167-7.00009-2>.

23. Janssens Sophie et.al, 'Functional Diversity and Regulation of Different Interleukin-1 ReceptorAssociated Kinase (IRAK) Family Members',2003,Molecular Cell, Vol. 11, 293–302.
24. Horst von Bernuth et.al, 'A Fast Procedure for the Detection of Defects in Toll-like Receptor Signaling', PEDIATRICS, (2006), Volume 118,doi:10.1542/peds.2006-1845.
25. Sherwood Lauralee. 'Εισαγωγή στην φυσιολογία του ανθρώπου-Από τα κύτταρα στα συστήματα',8^η έκδοση, σελ.526-538.
26. Μπούρα Παναγιώτα, 'Κλινική Ανοσολογία',σελ.19-36.
27. Ζίφα Αιμιλία, 'Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος', Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2^η Έκδοση, σελ.393-402.
28. Yereodu Susan T. et.al, 'IRAK4 and TLR3 sequence variants may alter breast cancer risk among Africa-American women', frontiers in Immunology,(2013),Vol.4,Article338,
<http://www.frontiersin.org/Immunology/editorialboard>.
29. <https://www.omim.org/entry/607676?search=IRAK4&highlight=irak4>
30. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/irak4>
31. https://www.paed-anosia.gr/contents_gr.asp?category=11&id=316
32. Abbas Abul K. et.al, 'Cellular and Molecular Immunology'. Elsevier. 7th Edition. Pages 55-76.
33. Medvedev Andrei E. et.al, 'Distinct Mutations in IRAK-4 Confer Hyporesponsiveness to Lipopolysaccharide and Interleukin-1 in a Patient with Recurrent Bacterial Infections'.The Journal of Experimental Medicine. 2003.Volume. 198, Number 4. 521–531.<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20030701>.
34. Al-Mousaet.al, 'Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases'. J. Allergy Clin. Immunol. 2016. Volume 137. Number 6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1310>.
35. Sic Heiko et.al, ' An Activating Janus Kinase-3 Mutation Is Associated with Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4-Dependent Immune Dysregulation Syndrome'. Front. Immunol. 8:1824. 2017.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01824>.

36. Gosu Vijayakumar et.al, 'Molecular Evolution and Structural Features of IRAK Family Members'. (2012).PLoS ONE 7(11): e49771. doi:10.1371/journal.pone.0049771.
37. Σπελέτας Μ.Γ., Γερμενής Α.Ε, 'Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες στους ενήλικες Σύγχρονη κλινική προσέγγιση'. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής. 2013. 30(4):420-435.
38. Hoarau Cyrille et.al, 'TLR9 Activation Induces Normal Neutrophil Responses in a Child with IRAK-4 Deficiency: Involvement of the Direct PI3K Pathway'. J Immunol.2007; 179:4754-4765; ; doi: 10.4049/jimmunol.179.7.4754.\